



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

ヒツジアンギオテンシノーゲンcDNAのクローニングとその発現産物の性質

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 永瀬, 雅啓 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2383

氏 名 (本 籍)	永 瀬 雅 啓 (静岡県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第42号
学 位 授 与 年 月 日	平成7年3月14日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	ヒツジアンギオテンシノーゲン cDNA のクローニングとその発現産物の性質
審 査 委 員	主査 岐阜大学 教授 中 村 征 夫 副査 静岡大学 教授 竹 内 久 直 副査 信州大学 教授 黒 沢 辰 一 副査 岐阜大学 教授 河 合 啓 一 副査 岐阜大学 助教授 鈴 木 文 昭

論 文 の 内 容 の 要 旨

アンギオテンシノーゲンは、レニン・アンギオテンシン系の酵素レニンの基質である。すなわちアンギオテンシノーゲンのN末端側10残基目と11残基目の間のペプチド結合がレニンによって切断され、デカペプチドであるアンギオテンシンⅠが生成される。この酵素反応は昇圧ホルモンであるアンギオテンシンⅡを生成する一連の反応の律速段階であるため、生体における血圧調節において重要な役割を演じている。レニン・アンギオテンシノーゲン反応の機構を分子レベルで解明する観点からレニンの構造と機能に関する研究が精力的に行われ、現在ではレニン分子の立体構造も明らかにされている。他方、アンギオテンシノーゲンは、レニンの基質となりうる、現在までに報告されている唯一の天然蛋白質であり、同じアンギオテンシノーゲンであっても、例えばラット・アンギオテンシノーゲンはヒト・レニンの基質となりうるが、ヒト・アンギオテンシノーゲンはラット・レニンの基質になりえないなど、種間に特異性があることが知られている。

レニン・アンギオテンシノーゲン反応の機構を解明するためには、レニン分子の構造に関する知見のみならず、基質蛋白質であるアンギオテンシノーゲン分子の構造に関する知見もまた不可欠であり、そのためには純粋なアンギオテンシノーゲンが大量に必要となる。しかし、血中におけるアンギオテンシノーゲン含量が極めて低いため、その単離・精製は難しく、立体構造が解明されていないのは無論のこと、一次構造さえも現在までに報告さ

れているのはヒト、ラット、およびマウスの3種類に過ぎない。

そこで本研究は(1)ヒト・レニンに対して、ヒト・アンギオテンシノーゲンよりも10倍反応性が高いヒツジ・アンギオテンシノーゲンの遺伝子を、クローニングし、その塩基配列を決定する、(2)cDNAを培養細胞系に組み込み、組み換え型ヒツジ・アンギオテンシノーゲンの大量発現系を確立する、(3)組み換え型ヒツジ・アンギオテンシノーゲンの大量精製法を確立する、ならびに(4)その生化学的諸性質を解明する、ことを目的として行われた。

はじめに、ヒツジ肝臓cDNAライブラリーからヒト・アンギオテンシノーゲンcDNAのBst IIフラグメント(1.3kb)をプローブとしてヒツジ・アンギオテンシノーゲンcDNAをクローニングした。その全塩基配列をジデオキシ法で決定したところ、全長は1934bpで、1428bpの翻訳領域を含んでいた。そこから演繹されたヒツジ・アンギオテンシノーゲンの全アミノ酸残基数は452となり、ヒト・アンギオテンシノーゲンと同じであったが、ラットおよびマウスよりも1アミノ酸残基短かった。ヒト、ラット、およびマウス・アンギオテンシノーゲンには、レニンによる切断部位の近傍(14位もしくは23位)にN型糖鎖付加部位が存在するが、ヒツジ・アンギオテンシノーゲンには存在しなかった。

得られたヒツジ・アンギオテンシノーゲンcDNAをpSVDのBam HIサイトにサブクローニングした発現プラスミドpSVsAGDを作製し、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)細胞BDX-11株にリン酸カルシウム法にて形質導入した。メトトレキサート濃度を段階的に高めたり、培養条件を工夫することにより培地1リットル当り最高38mgのヒツジ・アンギオテンシノーゲンを生産させることに成功した。

精製は濃縮、透析、ならびにCM-Toyopearlイオン交換クロマトグラフィーによって行われ、精製倍率3.90倍、収率53%で、比活性 $21.1 \mu\text{g Ang I/mg}$ の、SDS-電気泳動的に均一なアンギオテンシノーゲン標品を得ることに成功した。

得られた組み換え型ヒツジ・アンギオテンシノーゲン標品の生化学的諸性質を調べたところ、N末端27位までのアミノ酸配列はcDNAから演繹された配列と同一であり、分子量もSDS-PAGEで56,000となり、天然型ヒツジ基質と同一であった。ヒト・レニンに対する K_m 値も $0.2 \mu\text{M}$ で、天然型ヒツジ基質と同一であった。ヒツジ基質の10位~12位の配列はLeu-Leu-Valでヒト基質のそれ(Leu-Val-Ile)と異なっているが、ヒト・レニンによって切断される部位はヒト基質の場合と同様に10位と11位の間であった。50°Cまでは熱に対して安定で、反応性が50%消失する温度は56.4°Cと算出され、ヒト基質のそれとほぼ同じであった。pH5以下では安定であるが、pH8にして長期間保存するとその反応性は経時的に低下した。しかしこの失活は酸性pHに戻すことによって回復した。各種レクチンと結合したことから、組み換え型ヒツジ・アンギオテンシノーゲンも糖タンパク質であると結論された。組み換え型ヒツジ・アンギオテンシノーゲンに対して得られたウサギ抗血清は天然型ヒツジ・アンギオテンシノーゲンとは交叉したが、ヒト・アンギオテンシノーゲン、ラット血清、ブタ血清、オボアルブミン、カゼイン、ウシ血清アルブミンとは交叉せず、極めて高い特異性を有することが明かとなった。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、ヒト・レニンに対して、ヒト・アンギオテンシノーゲンよりも10倍反応性が高いヒツジ・アンギオテンシノーゲンの遺伝子をクローニングし、その塩基配列を決定すること、そのcDNAを培養細胞系に組み込み、組み換え型ヒツジ・アンギオテンシノーゲンの大量発現系を確立すること、発現された組み換え型ヒツジ・アンギオテンシノーゲンの大量精製法を確立すること、ならびに得られた組み換え型ヒツジ・アンギオテンシノーゲンの生化学的諸性質を解明することを目的として行われた。

本論文の第1章は緒論で、研究の背景、目的などが的確に記述されている。第2章にはヒツジ肝臓cDNAライブラリーからヒト・アンギオテンシノーゲンcDNAのBst IIフラグメント(1.3kb)をプローブとしてヒツジ・アンギオテンシノーゲンcDNAをクローニングし、その全塩基配列1934bpの決定に成功したことが記述されている。アンギオテンシノーゲンcDNAのクローニングはヒト、ラット、マウスに次いで世界で4番目の成果である。そこから演繹されたアミノ酸配列から、ヒト、ラット、およびマス・アンギオテンシノーゲンに存在するレニンによる切断部位近傍のN型糖鎖付加部位が、ヒツジ・アンギオテンシノーゲンには存在しないことを明らかにした。これらの内容は学位論文の基礎となる学術論文1に報告されている。

第3章では、ヒツジ・アンギオテンシノーゲンcDNAをチャイニーズハムスター卵巣細胞に導入し、培養条件等を工夫することにより、最終的には培地1リットル当たり約40mgのヒツジ・アンギオテンシノーゲンを生産させることに成功したことから、同タンパク質の大量精製法を確立したことが記載されている。この結果は従来ヒト・アンギオテンシノーゲンについて得られていた実績を20倍以上越えるものである。この成果は、高純度のアンギオテンシノーゲンを大量に入手することが出来なかったために、いままで不可能であった、タンパク質基質アンギオテンシノーゲンをを用いたレニン反応機構の解析や、アンギオテンシノーゲンのX線結晶回折へと道を開くものであり、今後のレニン研究の発展に寄与するところ大であると評価された。

第4章には、得られた精製組み換え型ヒツジ・アンギオテンシノーゲン標品のアミノ酸配列、分子量、ヒト・レニンによる切断点、ヒト・レニンに対する K_m 値、温度安定性、pH安定性、ポリクローナル・ウサギ抗体の特異性、各種レクチンとの反応性などの諸性質が記載しており、組換え型ヒツジ・アンギオテンシノーゲンが天然型ヒツジ基質同様に、ヒト・レニンの良好な基質となりうることを実証している。このうちpH安定性に関する部分が学位論文の基礎となる学術論文2に報告されており、その内容はアンギオテンシノーゲンをpH8で長期間保存すると、pHに依存して可逆的に、その基質としての活性が低下するというものである。これはレニン活性を測定する際の、いままで知られていなかった留意点を明らかにしたという点において、学術的にも臨床的にも重要な知見であると評価された。

以上、本委員会は論文の構成・内容、基礎となる学術論文等を慎重審議した結果、審査委員全員一致をもって本論文は博士の学位を授与するに値する論文であると判定した。

学位論文の基礎となる学術論文

- 1) M. Nagase et al., Biosci. Biotech. Biochem., **58**(10), 1884 (1994).
- 2) M. Nagase et al., Biosci. Biotech. Biochem., **59**(4), (1995), in press.